

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-058

全细胞人工金属酶的工程化策略及应用研究

张英娇¹, 刘晓宇¹, 王云鹏¹, 相林², 李春^{2,3,4}, 王润铭^{1,4,5}

(¹ 清华大学深圳国际研究生院生物医药与健康工程研究院, 广东深圳 518055; ² 清华大学化工系, 北京 100084; ³ 北京理工大学化学与化工学院, 北京 100101; ⁴ 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084; ⁵ 活性蛋白多肽绿色生物制造广东普通高校重点实验室, 广东深圳 518055)

摘要: 人工金属酶 (Artificial metalloenzymes, ArMs) 将非天然金属催化中心整合至蛋白质支架中, 兼具金属催化剂的反应多样性和生物大分子的选择性识别能力, 为拓展天然酶催化反应边界提供了重要工具。体外重构 ArMs 已在不对称转移氢化、不对称环丙烷化及 C-H 键不对称官能化等反应中展现出独特优势, 但其进一步的应用仍受限于蛋白纯化成本高、催化体系稳定性不足等问题。将 ArMs 构建于活细胞或细胞衍生体系中, 依托细胞代谢网络与保护机制, 以及区室化结构等特点, 提升了催化剂稳定性及生产效率; 同时支持多步级联反应及高通量筛选, 展现出工业化应用潜力。本文系统梳理了全细胞体系下 ArMs 的最新进展, 核心内容涵盖三大模块: 一是细胞组装与定位策略, 重点分析细胞质、周质空间、细胞表面三类空间定位方式的技术原理、研究突破与适用场景; 二是分子改造与高通量筛选技术体系, 总结了从随机突变到计算驱动的多层次突变文库构建方法, 以及无细胞提取物筛选、全细胞-光谱联用筛选等技术革新; 三是场景化应用进展, 详细阐述了其在肿瘤靶向治疗与高值化学品生物合成两大领域的代表性研究。最后, 分析了该领域在金属辅因子稳定性、蛋白表达调控及催化性能优化等方面面临的挑战, 并对人工智能与合成生物学深度融合驱动的未来发展方向进行了展望。

关键词: 人工金属酶; 全细胞催化; 细胞组装与定位; 分子改造; 高通量筛选; 肿瘤靶向治疗; 高值化学品; 生物合成

中图分类号: Q55 文献标志码: A

Advances in Engineering Strategies and Applications of Whole-Cell Artificial Metalloenzymes

ZHANG Yingjiao¹, LIU Xiaoyu¹, WANG Yunpeng¹, XIANG Lin², LI Chun^{2,3,4}, WANG Runming^{1,4,5}

(¹Institute of Biopharmaceutical and Health Engineering, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China; ²Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ³School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100101, China; ⁴Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Beijing 100084, China; ⁵Key Laboratory of Active Proteins and Peptides Green Biomanufacturing of Guangdong Higher Education Institutes, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: Artificial metalloenzymes (ArMs) are biohybrid catalysts that integrate non-natural metal catalytic centers

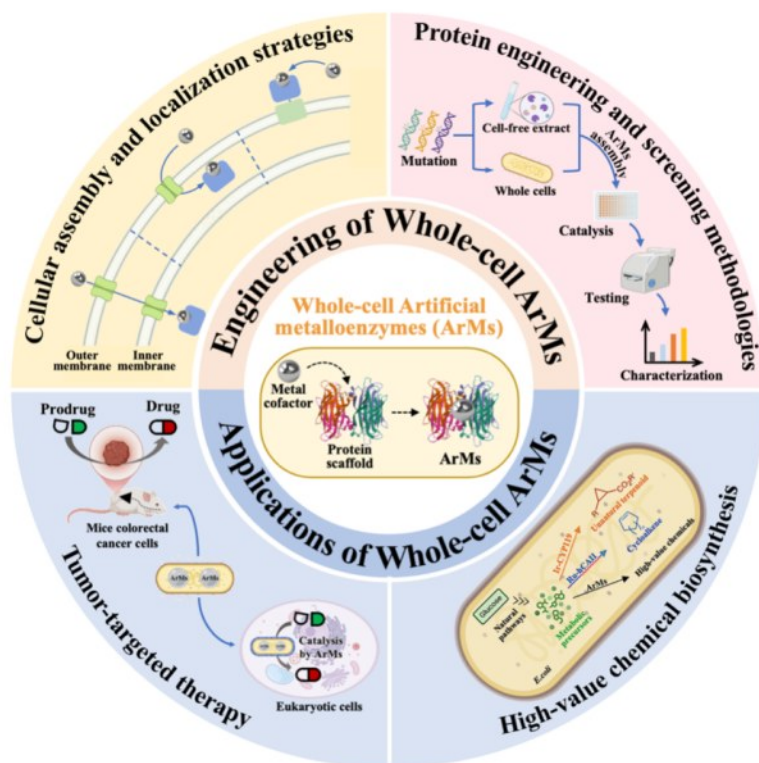
收稿日期: 2026-06-24 修回日期: 2026-08-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22307063); 广东省“珠江人才计划”引进创新创业团队项目 (2023ZT10C040)

引用本文: 张英娇, 刘晓宇, 王云鹏, 相林, 李春, 王润铭. 全细胞人工金属酶的工程化策略及应用研究[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-058

Citation: ZHANG Yingjiao, LIU Xiaoyu, WANG Yunpeng, XIANG Lin, LI Chun, WANG Runming. Advances in Engineering Strategies and Applications of Whole-Cell Artificial Metalloenzymes[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-058

into protein scaffolds. By combining the broad reaction diversity of metal catalysts with the precise recognition capability of biological macromolecules, ArMs provide a critical tool for expanding the catalytic boundaries of natural enzymes. In vitro reconstituted ArMs have demonstrated unique advantages in a range of asymmetric transformations, including transfer hydrogenation, cyclopropanation, Michael addition, and C – H bond functionalization. However, their practical application remains constrained by multiple limitations, including high protein purification costs, insufficient stability, challenges in cofactor regeneration, and limited compatibility with complex reaction environments. Constructing ArMs within living cells or cell-derived systems enhances catalyst stability and production efficiency by leveraging the host cells' intrinsic metabolic networks, protective mechanisms, and compartmentalized structures. Furthermore, whole-cell systems support autonomous cofactor regeneration, multi-step cascade reactions, and high-throughput directed evolution screening, demonstrating remarkable potential for industrial applications. In recent years, whole-cell ArM systems have achieved non-natural catalytic reactions including olefin metathesis and C – H bond activation, thereby expanding the inherent reaction scope of natural enzymes. Nevertheless, their development still faces core challenges in catalytic efficiency optimization, metal cofactor delivery, and large-scale preparation. This review systematically summarizes engineering strategies and application progress for ArMs in whole-cell systems, and is organized into three core modules. First, intracellular assembly and localization strategies are discussed, covering the fundamental principles and breakthroughs in cytoplasmic assembly, periplasmic localization, and cell-surface display. Second, the technological framework of protein engineering and high-throughput screening is reviewed, including multi-level mutant library construction and various innovative screening approaches. Third, scenario-based applications are examined, with emphasis on tumor-targeted therapy and high-value chemical biosynthesis. Finally, future directions are discussed, highlighting the deep integration of artificial intelligence and synthetic biology as a key driver of future technological advancement. The insights presented in this review are expected to provide theoretical support and decision-making references for the development of efficient and stable bio – non-biological hybrid catalytic systems.



Keywords: Artificial metalloenzymes (ArMs); Whole-cell catalysis; Cellular assembly and localization; Protein engineering; High-throughput screening; Tumor-targeted therapy; High-value chemicals; Biosynthesis

金属酶作为自然界进化形成的高效催化系统，通过其金属活性中心实现精准的选择性催化。然而，天然金属酶的催化功能受限于固有底物特异性和反应类型，难以满足现代合成化学的多样化需求^[1]。相比之下，化学金属催化剂虽具有反应范围广、设计灵活等优势，但存在反应条件苛刻、选择性差及生物相容性低等缺陷^[2]。为突破这些限制，人工金属酶（artificial metalloenzymes, ArMs）应运而生，通过将金属配合物与蛋白质骨架相结合，构建了一种兼具生物催化特异性和化学催化灵活性的“半合成”催化体系^[3]。

人工金属酶（ArMs）的发展历程可划分为三个阶段（图1）：

①初期探索阶段（1950s-1990s）：聚焦于构建金属-蛋白杂合体。代表性成果包括利用蚕丝纤维负载钯配合物实现不对称还原^[4]，以及在生物素-亲和素（biotin-avidin）体系中嵌入二磷-铑（Rh）配合物，构建首个人工氢化酶模型^[5]，验证了化学催化与生物载体结合的可行性。

②工程化改造阶段（2000-2020年）：借助蛋白质工程与分子生物学工具，将ArMs功能拓展至非天然催化领域。重要进展包括构建一氧化氮（NO）还原酶的功能模型^[6]、人工亚硫酸盐还原酶（sulfite reductase, SiR）^[7]等功能模型，特别是实现了金属-β-内酰胺酶在大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）周质中的功能性表达^[8]，首次将ArMs催化拓展至全细胞体系。

③理性设计阶段（2021年至今）：计算生物学与蛋白质工程技术的深度融合，推动ArMs开发迈入从头设计（*de novo*）与智能进化协同发展的新纪元。研究者能够从头设计可结合金属辅因子的蛋白质骨架以催化卡宾转移等反应^[9]，或将无活性的蛋白质支架通过计算引导的进化改造为高效

的Diels-Alder环加成酶^[10]。更进一步的突破体现在全细胞体系的深度工程化：通过异源酶与ArMs的协同实现体内非天然产物合成^[11]；利用液-液相分离（liquid-liquid phase separation, LLPS）等前沿技术，在细胞内构建人工隔室以富集并稳定ArMs^[12]，从而提升了全细胞催化效率。2026年，研究者依托从头设计串联重复蛋白骨架锚定N-杂环卡宾金（I）辅因子构建人工金氢胺化酶，经结构导向突变实现催化活性4倍提升，且该骨架在高温、酸性及有机溶剂条件下保持稳定^[13]。

上述进展表明ArMs已从单一功能模拟走向多层次、多组分、可编程的复杂生物制造体系，为绿色化学与合成生物学提供了革命性工具。

尽管体外ArMs展现出良好的催化潜力，但其应用常受限于反应条件苛刻（如有机溶剂兼容性差）、辅因子再生困难及蛋白纯化成本高等问题。在此背景下，将ArMs装配于完整细胞中构建的全细胞催化体系，为解决上述挑战提供了新的思路。该体系通过在活细胞或细胞衍生体系中整合ArMs，充分利用细胞自身的维持、再生机制及代谢网络，显著拓展了生物催化的应用范围^[14]。相较于需要纯化后使用的传统酶体系，全细胞ArMs体系在稳定性、经济性与反应兼容性方面具有明显优势（表1）。全细胞体系不仅借助细胞的天然保护机制维持酶活性，还避免了繁琐的纯化步骤，降低了生产成本。此外，该系统能够串联细胞内源区室化结构、代谢网络、辅酶再生系统及自我维持机制等，实现多步级联催化反应，并支持基于细胞的高通量定向进化筛选，因此在工业生物催化与规模化生物制造中展现出重要潜力^[15]。近年来，通过基因编码、生物正交组装与外源递送等策略，研究人员已成功构建了可催化烯烃复分解、C-H键活化等非天然反应的全细胞ArMs系

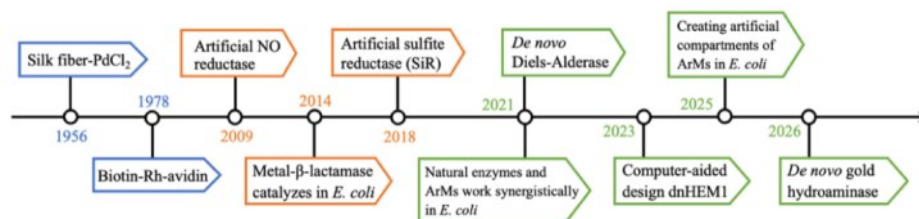


图1 ArMs发展过程中的关键案例

Fig. 1 Timeline of key milestones in the development of ArMs

统^[16, 17]。然而，该体系仍面临催化效率有限、金属催化剂细胞毒性及规模化制备困难等挑战。当前，合成生物学技术的迭代升级为应对这些挑战提供了新工具：计算机辅助设计可精准优化金属结合位点与活性口袋结构^[18]；定向进化与高通量筛选相结合持续提升催化性能^[19-21]；代谢工程则通过调控宿主代谢状态来增强其与异源催化体系的兼容性^[22]。

综上，全细胞 ArMs 已成为连接化学催化与合成生物学的关键桥梁。未来研究应聚焦于：金属-蛋白界面稳定性强化、亚细胞精确定位、多酶-ArMs 协同级联，以及面向临床与工业应用的工程化验证，从而推动该领域从实验室概念迈向可持续、可放大的实际应用。

当前已发表的关于 ArMs 的综述主要聚焦于体外重构体系，涵盖蛋白骨架与金属配合物的组装机制^[23-30]、活性中心设计策略（如定向进化、理性设计及蛋白锚定技术优化）^[19, 31-35]及 ArMs 在合成化学中的应用^[3, 36, 37]，但较少系统讨论全细胞体系下 ArMs 的构建与应用^[14, 15, 38]。相比之下，本文系统综述了全细胞体系下 ArMs 的研究进展，重点探讨其细胞组装与定位策略、分子改造与筛选方法及其在肿瘤靶向治疗与高值化学品生物合成领域的应用前景与未来发展方向，为设计高效、稳定的生物-非生物杂合催化系统提供关键理论依据与技术路径。

1 人工金属酶的细胞组装与定位策略

ArMs 旨在将合成金属催化剂锚定于手性蛋白

质支架中，以融合化学催化的广谱性与生物催化的高选择性。其主要构建策略包括两类：一是辅因子置换策略，即在原生活性位点中置换天然金属辅因子，以赋予其新的催化功能^[39]；二是锚定封装策略，即通过共价、非共价或超分子相互作用等方式将合成金属配合物引入蛋白质空腔的策略^[3]。这些策略需遵循互补协同原则：金属辅因子需兼具催化活性与结构适配性，而蛋白质骨架则应提供适宜的空间构型、化学微环境及动态稳定性^[40]。然而，这些策略均面临一个共同的核心挑战：锚定形成的第二配位球微环境常难以匹配目标反应，导致初始催化活性不足，通常需要借助定向进化等蛋白质工程手段进行后续优化^[16, 41]。

当前，研究趋势正从体外组装转向活细胞内的原位构建。这一转变基于胞内系统的显著优势：全细胞催化更具经济性，便于开展定向进化，并为构建新型合成代谢途径提供可能^[38]。但同时，胞内应用也面临严峻挑战，主要包括如何在复杂生理环境中实现 ArMs 的高效原位组装，并确保金属辅因子能抵御水、氧及谷胱甘肽等代谢物的攻击以维持其稳定性与生物相容性^[42]、底物及产物的胞内外传输效率。因此，ArMs 的细胞组装与定位策略成为决定其催化性能的关键，直接调控着金属辅因子的组装效率、底物可及性及整个催化系统的稳定性。

目前，ArMs 的全细胞表达主要依赖三类宿主系统：原核表达系统（如 *E. coli*）^[12]、真核微生物（如莱茵衣藻）^[43]以及高等真核系统（如人胚胎肾细胞）^[44]。其中，*E. coli* 因其成熟的遗传操作系统、高效的蛋白表达能力和灵活的细胞定位策略，

表1 全细胞 ArMs 体系与体外 ArMs 体系的比较

Table 1 Comparison between whole-cell ArMs and in vitro ArMs systems

特征	全细胞 ArMs 体系	体外 ArMs 体系
稳定性	受细胞环境保护，但胞内代谢组分易干扰催化活性	反应体系组分可控，但蛋白稳定性易受外界条件影响
制备成本	省去昂贵的蛋白纯化与固定化步骤，但金属辅因子消耗量更高	蛋白纯化、载体固定等成本高，金属辅因子用量可精准调控
技术要求	需解决金属毒性、辅因子递送、ArMs 胞内组装等问题	纯化酶与金属辅因子在体外组装，条件可控
反应兼容性	底物、产物需满足细胞耐受性；可耦合胞内代谢，无需外源添加辅酶和昂贵反应前体	兼容非生理条件，不受膜透性限制；但辅酶及反应前体需外源添加
筛选效率	可基于细胞生长或荧光信号建立高通量筛选平台	蛋白需单独纯化后检测，筛选操作繁琐、通量较低

成为最广泛使用的宿主^[24]；同时其低成本培养的特点，使其在规模化应用中展现出良好的潜力。以 *E. coli* 为例，研究者已成功开发出三种空间定位策略（图2）：细胞质定位、细胞周质定位和细胞表面展示策略^[34]。精准调控这些定位方式可优化辅因子组装、提高催化效率与系统稳定性，为 ArMs 的全细胞工程化改造提供重要依据。

1.1 细胞质组装与定位策略

细胞质内组装与定位是构建 ArMs 的一种高效策略，通过在胞质内表达特定蛋白质支架，可直接完成 ArMs 的组装与定位，使其高效参与催化反应。小分子底物可经跨膜扩散进入胞质与酶作用，

进一步扩展了该策略的适用性。然而，该策略仍面临多项挑战，主要包括金属辅因子的递送、底物跨膜传输效率不足，以及细胞质中毫摩尔浓度水平的还原型谷胱甘肽（Glutathione, GSH）、半胱氨酸以及蛋白质巯基等组分可能抑制多种金属辅因子的活性^[24]。

金属辅因子的递送是在细胞质内构建 ArMs 的核心挑战，目前已发展出多种递送策略。对于血红素类辅因子（如 Ir、Ru 卟啉复合物），传统方法依赖血红素缺陷菌株或 ChuA 转运系统，但存在操作复杂和膜功能干扰等问题^[45]。相比之下，*E. coli* Nissle 1917 (EcN) 菌株凭借其 colicin I 受体系统可高效转运多种金属卟啉复合物^[17]。在非血红

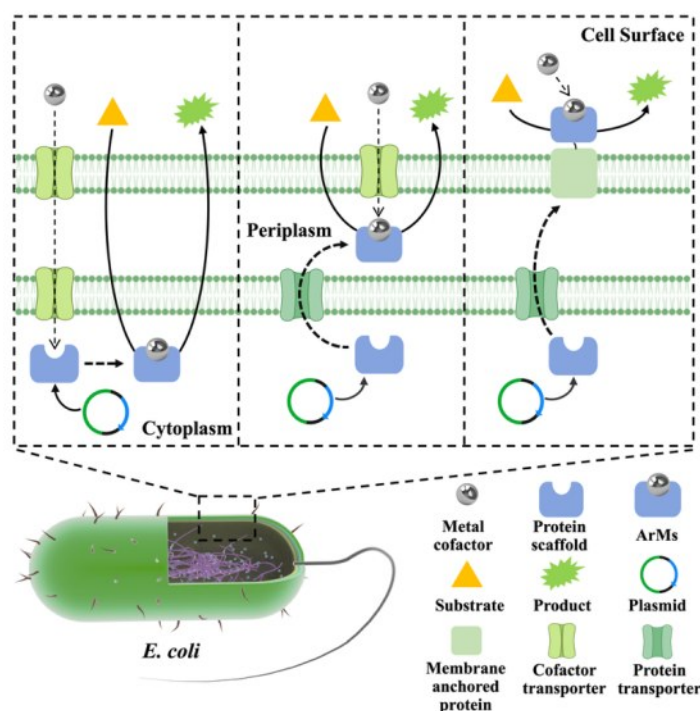


图2 大肠杆菌中 ArMs 的组装与定位策略

(ArMs 可定位于以下三个亚细胞区室：细胞质、细胞周质、细胞表面。细胞质：通过质粒表达蛋白支架，金属辅因子经辅因子转运体进入细胞质，ArMs 在细胞质完成组装与定位。底物经扩散或运输至细胞质，发生催化反应，产物随后排出胞外；细胞周质：质粒表达的蛋白支架通过转运系统转运至周质空间，金属辅因子通过相应转运体进入该区室。ArMs 在周质空间完成组装并催化底物转化；细胞表面：质粒表达的蛋白支架经转运系统分泌并锚定于细胞外膜表面。ArMs 在细胞表面完成组装，直接接触胞外环境中的底物进行催化反应。)

Fig. 2 Assembly and localization strategies of ArMs in *E. coli*.

(ArMs can be localized in three subcellular compartments: cytoplasm, periplasm, and cell surface. Cytoplasm: The protein scaffold is expressed via a plasmid, and the metal cofactor is transported into the cytoplasm by specific cofactor transporters. ArMs assemble in the cytoplasm, where substrates diffuse or are transported into the cytoplasm for catalytic conversion, and products are subsequently excreted. Periplasm: The plasmid-expressed protein scaffold is secreted into the periplasmic space by a transport system, and the metal cofactor is delivered to this compartment by corresponding transporters. ArMs assemble in the periplasm and catalyze substrate conversion. Cell surface: The plasmid-expressed protein scaffold is secreted by a transport system and anchored to the extracellular membrane surface. ArMs assemble on the cell surface, where they directly contact extracellular substrates for catalytic reactions.)

素金属递送方面, 基于 $[\text{Ni}(\text{L-His})_2]$ 复合物与 NikABCDE 转运系统的仿生策略实现了镍离子的特异性递送和功能性组装^[46]。

除主动转运系统外, 被动扩散策略也显示出独特优势。以 Cu(II) -邻菲啰啉 (1,10-phenanthroline, phen) 配合物为例, 其可通过被动扩散与乳酸菌多药耐药调节蛋白 (*Lactococcal multidrug resistance regulator*, LmrR) 自组装形成活性 ArMs, 并能高浓度 GSH 的胞内环境中保持稳定。研究发现, LmrR 带负电的入口通道通过电荷作用排斥同样带有负电的 GSH, 从而维持了 Cu(II) 的催化活性^[47]。针对细胞质 ArMs 的稳定性问题, LLPS 技术通过构建仿生蛋白质人工区室实现了突破。该技术能有效隔离有害胞内环境, 为活细胞复杂催化网络的设计提供了新思路^[12]。

遗传密码扩展技术通过引入非天然氨基酸 (noncanonical amino acids, ncAAs) 实现蛋白质的位点特异性精准修饰, 为 ArMs 构建提供高效可控的新方法。该突破性技术可直接在活细胞内组装功能性 ArMs, 消除传统随机辅因子锚定的不确定性, 同时简化了体外纯化流程^[48]。通过终止密码子抑制技术, 研究人员已将多种金属结合 ncAAs 成功嵌入蛋白支架: (1) (2,2'-联吡啶-5-基) 丙氨酸 (BpyAla) 修饰的 LmrR 蛋白表现出优异的 Cu 催化活性, 可实现 83% 对映选择性的 Friedel-Crafts 烷基化反应^[49]; (2) 2-氨基-3-(8-羟基喹啉-3-基) 丙氨酸 (HQAla) 整合使蛋白获得多金属结合能力 ($\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Rh}^{\text{III}}$), 展现出广泛的催化适应性^[50]; (3) 将膦配体 (P3BF) 引入 LmrR 蛋白构建含膦-环钯复合物的 ArMs, 具有极大的应用潜力^[51]; (4) 4-巯基苯丙氨酸 (pSHF) 修饰则构建了高效的贵金属结合位点, 赋予蛋白质氢胺化活性^[52]。这些创新设计使单一蛋白支架可通过不同配体结合多种金属离子并催化多样化反应。该技术已经成功应用于体内级联反应系统: 通过对氨基苯丙氨酸 (pAF) 嵌入 LmrR 蛋白支架构建 ArMs, 与天然酶协同形成级联催化网络, 实现从醛到脘的连续生物转化^[53]。上述研究表明, 遗传编码型 ArMs 不仅可用于单步非天然反应, 也具备与宿主代谢网络或天然酶体系深度耦合的潜力, 为构建复杂全细胞生物催化系统提供了新的技术路径。

1.2 细胞周质组装与定位策略

细胞周质组装与定位策略通过将 ArMs 定位于内外膜间的周质空间, 充分发挥该亚细胞区室独特的物理化学环境: 一方面有效规避细胞质组分的干扰, 另一方面有助于提升酶的稳定性和催化效率。这一策略的核心优势源于周质空间特殊的氧化还原环境: 适度的氧化条件不仅有利于维持金属酶的结构稳定性, 同时该区域较低的 GSH 浓度还能有效防止金属辅因子被还原失活, 从而显著增强催化体系的活性和稳定性。在技术实现上, 研究人员主要采用 Sec 分泌途径, 利用果胶酸裂解酶 B (pectate lyase B, PelB) 或外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA) 信号肽引导靶蛋白进入周质空间, 确保其正确折叠并与金属辅因子高效组装^[8, 16]。

在多种周质表达策略中, 生物素-链霉亲和素 (biotin-streptavidin, biot-SAV) 技术平台展现出显著优势。研究人员通过基因工程技术构建周质表达菌株, 将 OmpA 信号肽与 T7 标记的链霉亲和素 (streptavidin, SAV) 融合, 成功引导 SAV 分泌至周质空间。通过在含生物素化金属辅因子的缓冲液中培养细胞, 实现了全酶 (biot-Ru-SAV) 的功能性组装, 其催化烯烃复分解反应的效率显著优于传统胞内体系^[16]。进一步研究发现, biot-SAV 平台可适配多种金属辅因子, 例如磺酰胺环戊二烯基铱 (IrCp) 辅因子与携带 OmpA 信号肽的 SAV 结合后, 可在周质空间内驱动喹啉阳离子底物的高效转移氢化, 充分体现了模块化设计的灵活性^[54]。为进一步优化 ArMs 的性能, Vornholt 等人基于 biot-SAV 技术开发了智能化筛选系统, 整合周质区室化技术与机器学习模型, 系统性评估了 400 种 ArM 突变体的性能。在 Ru 催化的烯烃复分解、烯丙基酯脱除, Au 催化的炔基环化等反应中, 部分突变体的催化活性提升达 15 倍, 验证了该技术在 ArMs 理性设计中的潜力^[55]。此外, 周质表达策略对多样化蛋白支架具有广泛适用性。以人类碳酸酐酶 II (human carbonic anhydrase II, hCAII) 为支架构建的转移氢化系统经 IrCp 辅因子结构优化后, 催化效率显著提升——周转数达 90 次, 周质产物产量较非周质体系提高 69 倍^[56]。Song 等人

开发了具有功能活性的金属- β -内酰胺酶周质表达系统,使工程菌株在氨苄青霉素处理条件下表现出显著生存优势^[8]。这些结果表明细胞周质区间能有效维持酶功能,实现辅因子组装,并赋予工程菌新特性。

尽管如此,周质定位策略仍存在一定局限。周质空间体积有限,目标蛋白的转运效率和折叠质量受信号肽类型、表达水平和宿主生理状态影响较大;同时,外膜通透性仍可能限制大分子底物或疏水性金属配合物进入周质空间。因此,未来周质 ArMs 的设计需综合优化信号肽选择、蛋白表达水平、金属辅因子递送方式和底物传质效率,以进一步提高其催化性能和工程适用性。

1.3 细胞表面组装与定位策略

细胞表面展示技术通过将 ArMs 锚定于细胞膜或细胞壁外侧,使其直接暴露于胞外环境,不仅显著提高了底物可及性,还能有效避免胞内代谢干扰。该技术特别适用于需要大分子或疏水性底物的催化反应,同时便于与荧光标记底物等筛选探针直接接触,结合流式细胞技术实现单细胞级活性筛选,大幅提升定向进化效率。目前 ArMs 细胞表面展示主要依赖三类锚定系统:第一,大肠杆菌脂蛋白-外膜蛋白 A (lipoprotein-outer membrane protein A, Lpp-OmpA) 融合结构域可有效锚定 SAV、hCAII、透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 等支架蛋白^[57-59];第二,革兰氏阴性菌的酯酶自转运体失活突变体 (esterase autotransporter, EstA) 可作为大分子酶或金属酶支架的高效展示平台^[60],其具有较大的蛋白容纳能力,已成功应用于硝基吡啶变体的表面展示,并推动了苯乙炔的高效聚合^[61];第三,借助冰核蛋白 (ice nucleation protein, INP) 的疏水结构域,可将酶定向定位至外膜表面,这一策略已被应用于转移氢化酶 (如 Ru1-hCAII) 的表面展示^[62]。

除人工锚定系统外,膜蛋白工程的最新突破是直接将细胞表面的天然膜蛋白或受体改造为功能性 ArMs。Jeong 等人通过蛋白质工程将大肠杆菌外膜蛋白 OmpF 成功改造为具有优异 β -立体选择性

且催化速率增加 2.8×10^9 倍的锌依赖性糖苷酶^[63]。另一开创性工作中, Ghattas 等人基于人 A_{2A} 膜受体设计 ArMs 系统,通过精确定位的 Cu(II) 催化中心在活哺乳动物细胞表面完成 Diels-Alder 环加成反应^[44]。这些成果不仅拓展了膜蛋白的功能多样性,更通过创新性地将天然膜结构与人工催化中心融合,为开发新一代细胞表面催化系统提供了重要技术路径。

这些研究表明,细胞表面展示不仅拓展了膜蛋白和细胞表面受体的功能多样性,也为在活细胞界面构建非天然催化反应提供了新路径。通过将天然膜结构与人工金属催化中心相结合,细胞表面 ArMs 有望在生物传感、细胞治疗、药物原位激活和可回收全细胞催化剂开发中发挥重要作用。然而,该策略仍面临展示蛋白取向和密度难以精确控制、金属辅因子脱落、胞外环境稳定性不足以及胞内代谢网络耦合较弱等问题。未来研究需进一步优化表面锚定模块、金属中心固定方式和筛选平台,以提高细胞表面 ArMs 的稳定性、选择性和应用转化潜力。

2 全细胞体系:人工金属酶分子改造的理想平台

近年来,ArMs 的分子改造取得显著进展,全细胞体系凭借其独特的生物学特性成为理想的改造平台^[14]。全细胞平台的优势主要体现在三方面:第一,细胞内天然的蛋白质合成机制简化了突变文库的构建;第二,完整的基因型-表型耦合机制支持高通量筛选;第三,细胞内微环境为金属辅因子提供了最接近实际应用条件的配位环境,从而更有利于获得具有应用潜力的催化变体^[64]。图3显示了 ArMs 的分子改造技术闭环流程,整体分为突变文库设计、突变文库构建、文库筛选、优势突变体表征四大环节。首先通过序列或蛋白结构分析完成文库设计;随后利用随机突变、定点突变或饱和突变等策略构建突变文库;再以无细胞提取物或全细胞为筛选载体,完成 ArMs 的组装后开展催化性能高通量筛选;最终对性能提升的突变体进行催化活性、热稳定性、对映选择性等指

标表征, 未达预期的突变体可再次进入文库设计环节实现迭代改造。

2.1 人工金属酶突变文库的构建策略

ArMs的分子改造策略已发展出多层次的突变库构建方法体系, 涵盖从随机突变到计算驱动的智能设计。随机突变技术作为基础方法, 通过易错PCR (error-prone PCR, epPCR) 和DNA改组 (DNA shuffling) 等技术构建高多样性文库, 特别适用于活性位点结构未知的体系^[65-67]。Yang等人建立了基于epPCR与生物正交固载的ArMs随机突变定向进化平台, 解决了合成金属辅因子引入后文库筛选的游离辅因子背景干扰难题; 通过构建脯氨酰寡肽酶骨架突变体库并结合自动化筛选, 获得对映选择性达92% ee的二铑环丙烷化催化剂, 同时证实该策略可发掘活性中心远端的有益突变, 且进化得到的ArMs可拓展至多种二铑催化反应^[68]。

随着结构生物学与计算技术的进步, 半理性设计已成为ArMs分子改造的主流策略之一^[69]。该策略将同源建模、Rosetta结构预测等计算工具^[70]与位点饱和突变 (site saturation mutagenesis, SSM)、组合活性位点饱和测试 (combinatorial

active-site saturation testing, CAST)^[71]和迭代饱和突变 (iterative saturation mutagenesis, ISM)^[72]等精准诱变技术相结合, 提升了进化效率。例如Heinisch等人开发的Lpp-OmpA锚定SAV展示系统, 通过两轮定点饱和突变获得双突变体 (S112M-K121A), 其表观活性提升36倍, 体外活性增强5.7倍^[57]。对于具有高分辨率晶体结构的体系, 基于结构的理性设计具有独特优势。研究者利用biot-SAV-Rh(III)复合物的晶体结构信息精确设计了N49位点突变, 实现了手性异吲哚啉酮合成中的对映选择性控制^[73]。更先进的组合策略整合计算与实验方法: 在将无活性的MID1sc蛋白改造为高效Diels-Alderase (DA7)的过程中, 先通过Rosetta设计与密度泛函理论模拟预测基础突变体, 再结合盒式诱变和热点诱变等实验进化方法, 最终获得的突变体催化效率超越天然酶^[10]。这些策略的发展体现了ArMs分子改造从经验筛选到理性设计, 再到智能预测的技术演进过程, 为ArMs的精准设计与性能优化提供了系统解决方案。

2.2 全细胞高通量筛选技术革新

2.2.1 无细胞提取物快速筛选

传统纯化酶筛选技术因依赖蛋白纯化步骤,

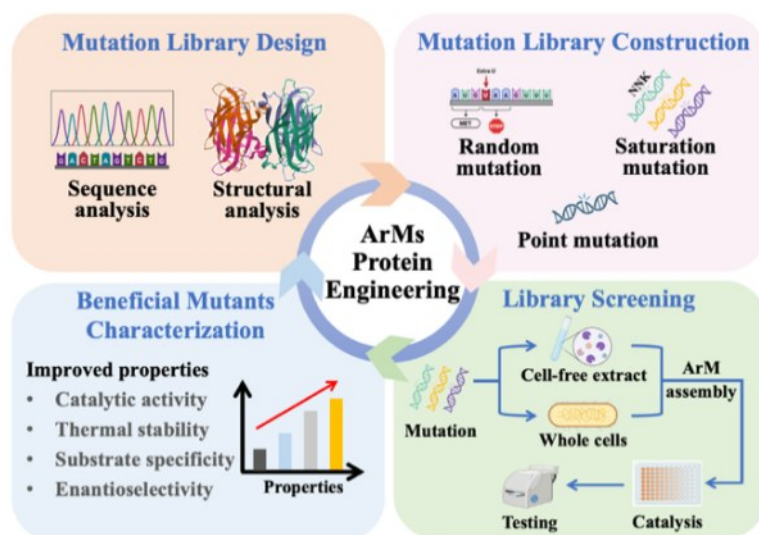


图3 ArMs的分子改造技术流程

(图中展示了ArMs的分子改造流程, 包括四个步骤: 突变文库设计、突变文库构建、突变文库筛选和有益突变体的表征。)

Fig. 3 Technical pipeline for protein engineering of ArMs

(The figure illustrates the protein engineering process of ArMs, which includes four steps: designing a mutant library, constructing the library, screening the library, and characterizing beneficial mutants.)

不仅筛选通量受限,且难以还原天然细胞内微环境。针对这一局限,无细胞提取物(**cell-free extract**, **CFE**)筛选技术应运而生。该技术使酶能在近生理条件下进行定向进化分子改造,同时保持与高通量筛选及天然蛋白质修饰环境的兼容性。然而,CFE体系仍面临胞内氧化还原环境导致的金属辅因子失活、复杂组分干扰以及蛋白表达与催化活性平衡等技术挑战。针对上述挑战,Thomas R. Ward团队通过引入二胺类DiAm氧化剂特异性阻断GSH与铱络合物的配位,有效防止了贵金属催化剂的中毒现象^[42]。在此基础上,研究团队构建了包含SAV 28个关键位点饱和突变的突变体库,利用微孔板平台实现高通量筛选,建立了完整的CFE筛选体系^[74]。该策略成功优化了人工转移氢化酶:经DiAm处理定量结合位点后,与生物素化[Cp*Ir(biot-p-L)Cl]辅因子偶联形成的金属酶,在亚胺转移氢化反应中表现出显著增强的催化活性和优异的底物选择性^[75]。此外,Yang等人基于epPCR的定向进化策略,直接利用CFE体系进行催化筛选,成功获得了环丙烷化对映选择性达92% ee的优化突变体^[68]。在人工过氧化物酶工程中,CFE筛选与计算设计协同应用,进一步鉴定出催化活性提升40倍且热稳定性显著增强的突变体^[9]。

2.2.2 全细胞平台与光谱技术联用

基于全细胞的ArMs分子改造平台整合了周质表达/表面展示系统与光谱检测技术。周质空间因其氧化性环境和低GSH浓度,能有效维持金属辅因子的稳定性;而表面展示策略则通过将酶固定于细胞外膜,显著提高底物可及性。结合光谱技术直接定量酶活,避免了繁琐的色谱分析,提升了筛选通量^[19]。在典型案例中,多种筛选平台展现出独特优势。Thomas R. Ward团队开发的周质定位biot-Ru-SAV系统,通过自淬灭喹啉底物产生荧光信号,经五轮筛选获得催化效率提升5倍的突变体^[54]。Baiyoumy等人构建了基于表面展示SAV与Ru-吡啶辅因子的人工脱烯丙基酶,并通过产物激活的绿色荧光蛋白(GFP)报告系统高效筛选出催化活性提升1.7倍的突变体^[76]。Xu等人则通过VHb表面展示结合紫外吸收光谱,建立了无标记的5-亚氨基-1,2,4-噻二唑合酶筛选平台,通过直

接监测产物特征吸收峰实现了酶活定量,经两轮CAST/ISM获得的六位点突变体展现出优异的底物适应性和全细胞催化效率^[58]。Vallapurackal等人开发的双乳液微流控系统利用皮升级液滴反应器,将单个大肠杆菌细胞与其催化产物封装在隔离微环境中,通过荧光激活细胞分选(**fluorescence-activated cell sorting**, **FACS**)实现超高通量筛选。该系统应用于脱烯丙基酶筛选时,单次实验可处理超过50万个变体,高活性突变体富集效率达68倍,显著超越了传统筛选方法^[77]。这些技术通过保持细胞完整性、优化反应微环境与提升检测通量,显著增强了ArMs的进化效率。

尽管基于全细胞平台的ArMs分子改造已取得显著进展,当前体系仍面临底物选择性不足和检测灵敏度受限等关键挑战。现有研究案例显示(表2),大多数ArMs仅能催化结构简单的模型底物,其催化效率和底物普适性远未达到实际需求。为突破这些限制,未来研究需要重点开发多模态检测系统提升分析灵敏度,结合微流控技术实现高通量筛选,并通过创新锚定蛋白设计优化金属活性中心的微环境调控。这些协同创新将推动ArMs在复杂底物转化和精准催化方面取得突破性进展。

3 全细胞体系中人工金属酶的应用

全细胞ArMs催化体系通过将人工金属催化剂与活细胞系统整合,赋予生物体非天然催化功能,拓展了传统生物催化的边界。目前,该体系已成功应用于多种非天然反应类型,包括烯烃复分解、C-H键功能化等反应,展示了其在合成化学中的巨大潜力。在此基础上,研究者进一步将全细胞ArMs的应用导向更具社会价值的方向:在肿瘤靶向治疗领域,负载ArMs的工程活细胞可作为细胞诊疗制剂,于体内特异性催化前药活化,原位生成活性药物并定点释放;在高值化学品生物合成领域,该体系可耦合胞内天然代谢网络,以廉价可再生底物合成高附加值化学品,避免了中间体的分离纯化步骤。以下将重点阐述全细胞ArMs在这两个关键领域中的研究进展与应用前景。

表2 基于全细胞平台的 ArMs 分子改造案例

Table 2 Examples of molecular modification of ArMs based on whole-cell platforms

序号	全细胞定位	蛋白支架	辅因子	催化反应	分子改造策略	筛选策略 ¹	参考文献
1	细胞质	Sav-SOD 嵌合体	Biot-LAuCl	氢胺化反应	迭代饱和和突变	细胞裂解物催化及 UPLC-MS 分析	[78]
2	细胞质	Sav	[Cp*Ir(biot- <i>p</i> -L) Cl]	转移氢化反应	迭代饱和和突变	细胞裂解物催化及 HPLC 分析	[75]
3	细胞质	CYP119	Ir(Me)MPIX	环丙烷化反应	迭代饱和和突变	全细胞催化及 GC-MS 分析	[11]
4	细胞质	CYP119	Ir(Me)MPIX	N-H 键卡宾插入反应	组合活性位点饱和和测试、迭代饱和和突变	全细胞催化及 HPLC/GC 分析	[79]
5	细胞质	CYP119	Ir(Me)MPIX	C-H 键卡宾插入反应	饱和和突变	全细胞催化及 HPLC/GC 分析	[17]
6	细胞质	<i>Pfu</i> POP	dirhodium cofactor	环丙烷化反应	易错 PCR、组合密码子突变	细胞裂解物催化及 HPLC 分析	[68]
7	细胞质	<i>Pfu</i> POP	dirhodium cofactor	环丙烷化反应	定点突变	纯化蛋白催化及 HPLC 分析	[80]
8	细胞质	LmrR	Cu ^{II} -Phen	Friedel-Crafts 烷基化和 Diels-Alder 反应	饱和和突变	全细胞催化及 HPLC 分析	[47]
9	细胞质	<i>De novo</i> 设计的肽 MID1sc	Zn ^{II}	Diels-Alder 反应	盒式诱变、易错 PCR、热点残基的聚焦诱变	细胞裂解物催化及荧光检测	[10]

续表2 基于全细胞平台的 ArMs 分子改造案例

Table 2 (Continued) Examples of molecular modification of ArMs based on whole-cell platforms

序号	全细胞定位	蛋白支架	辅因子	催化反应	分子改造策略	筛选策略 ¹	参考文献
10	细胞周质	Sav-FPD 嵌合体	[Cp*Ir(biot- <i>p</i> -L) Cl]	转移氢化反应	饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[54]
11	细胞周质	Sav	Biot-Ru	关环复分解反应	迭代饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[16]
12	细胞周质	细胞色素 cb562 变体 ^{C96} RIDC14	Zn ^{II}	β -内酰胺水解反应	饱和和突变	菌株抗生素压力筛选	[8]
13	细胞表面	Sav	[CpRu(QA-Biot) (OH ₂)]	脱烯丙基化反应	迭代饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[57]
14	细胞表面	Sav	[CpRu(QA-Biot) (OH ₂)]	脱烯丙基化反应	饱和和突变	全细胞催化及 GC 分析	[76]
15	细胞表面	hCAII	Ru-HG	关环复分解反应	饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[62]
16	细胞表面	hCAII	IrCp*	转移氢化反应	饱和和突变	全细胞催化及 SFC 分析	[59]
17	细胞表面	VHb	Co(ppIX)	硫脲氧化反应	组合活性位点饱和和测试、迭代饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[58]
18	细胞表面	OmpF	Zn ^{II}	水解反应	饱和和突变	全细胞催化及荧光检测	[63]

注：¹ UPLC-MS: Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; HPLC: High-Performance Liquid Chromatography; GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC: Gas Chromatography; SFC: Supercritical Fluid Chromatography

3.1 肿瘤靶向治疗应用

在肿瘤靶向治疗领域, ArMs 技术通过构建“靶向-催化-治疗”一体化平台, 成为突破药效与系统毒性矛盾的创新方案。其核心在于利用非天然金属催化中心实现肿瘤微环境响应的前药原位激活, 或催化生成具有活性抗肿瘤分子, 显著提高治疗选择性的同时降低脱靶毒性。然而, 该技术的体内应用仍面临两大挑战: 生理条件下金属催化中心的稳定性, 以及肿瘤特异性富集与免疫原性的平衡问题。围绕这些挑战, ArMs 的发展经历了从体外蛋白载体到细胞表面锚定再到工程化全细胞底盘的逐步演进, 在催化效率和靶向精度上不断提升。

针对稳定性问题, Katsunori Tanaka 团队开创性地利用人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 疏水口袋作为“分子保护舱”, 使 ArMs 在 20 mM GSH 环境中仍能保持稳定催化活性, 成功介导闭环复分解 (RCM) 等关键反应^[81]。同时开发的糖基化 ArMs (GArMs) 利用 N-聚糖模块识别肿瘤特异性凝集素受体, 实现了钌催化剂的准确定位 (图 4a)。该体系可激活前药尿贝利普林, 在多种癌细胞系中构建“识别-催化-杀伤”的级联反应。为提升靶向性并控制免疫原性, 该团队开发了基于血清白蛋白 (albumin, Alb) 的原位肿瘤靶向 ArM 策略: 通过静脉注射配体结合的钌催化剂, 在血液中利用 Alb 自组装成 ArM 并以环状 RGD 肽靶向肿瘤, 在病灶部位催化合成促凋亡肽段, 有效抑制肿瘤生长^[82]。

除传统外源受体靶向策略外, 细胞表面工程技术为 ArMs 的体内应用开辟了新维度。Ghattas 等人通过共价连接铜催化剂, 将人类 A_{2A} 腺苷受体 (癌症与帕金森病潜在靶点) 改造为膜锚定 ArMs (图 4b)。该体系在活体人胚胎肾 (HEK) 细胞表面表达, 既能实现立体选择性 Diels-Alder 反应, 又可利用内源受体作为蛋白支架降低免疫原性^[44]。最近开发的 ArM-Tag 系统进一步拓展了应用边界, 该系统整合钼辅因子、脂质锚和 SAV 支架, 通过催化细胞表面 O-脱烯丙基化反应产生短寿命亲电中间体, 实现了微米级邻近细胞精准标记, 已成功解析 CAR-T 细胞与肿瘤细胞的特异性相互

作用^[83]。

在肿瘤靶向递送方面, 大肠杆菌凭借对缺氧肿瘤微环境的先天趋化性成为理想活体载体。如图 4c 所示, 白玉罡团队直接利用细菌天然膜结构封装“即用型”催化剂, 通过细菌的天然靶向能力实现精准药物递送^[12]。在结直肠癌小鼠模型中, 该策略联合前药治疗的疗效超越传统化疗, 显著降低器官毒性并提高生存率。进一步采用阳离子星形聚合物修饰后, 可实现细菌穿透真核细胞膜, 实现肿瘤靶向的胞内药物激活^[84]。此外, Li 等人开发了一种位置可编程的 ArM 系统, 该系统通过链霉亲和素与钯配合物组装而成, 利用脂质锚或阳离子脂质体可实现细胞膜或细胞质的准确定位^[85]。在肿瘤治疗中, 阳离子脂质体负载的 ArMs 通过增强渗透与滞留效应 (Enhanced Permeability and Retention, EPR) 和正电荷作用高效富集至肿瘤细胞内部, 并激活阿霉素前药。动物实验显示, 该系统的前药转化率达 90% 以上, 抗肿瘤效果与游离阿霉素相当。这种“定位催化”策略将药物激活严格限制于肿瘤微环境, 为精准催化治疗提供了新范式。

3.2 高值化学品生物合成

在推动药物合成向绿色、高效转型的过程中, ArMs 展现出超越传统化学方法与天然酶的独特催化能力。如图 5 所示, ArMs 能够介导多种关键药物合成反应, 其核心优势源于酶-金属协同催化机制——通过整合合成化学的反应多样性与生物催化的立体选择性, 为高价值药物中间体的构建提供了新颖、可持续的合成路径^[36]。以 C-H 键活化为代表, Thomas R. Ward 团队开发的嵌入 SAV 的 Cu(I) 杂螯型配合物体系, 实现了 sp³ C-H 键卡宾插入反应的高效催化, 为 β-内酰胺和 γ-内酰胺等重要医药中间体的合成开辟了新途径 (图 5a)^[86]。在多样化催化方面, Zhou 等人创新性利用 LmrR 蛋白支架, 结合非天然氨基酸 (pAF) 与 Cu(II)-phen 络合物构建双功能平台, 高效催化迈克尔加成反应, 在药物合成中具有广泛应用 (图 5b)^[87]。除单一催化体系外, 协同策略进一步拓展了 ArMs 的应用。Tang 等人利用 Cu-ArMs 与商业化脂肪酶 (Novozym[®]

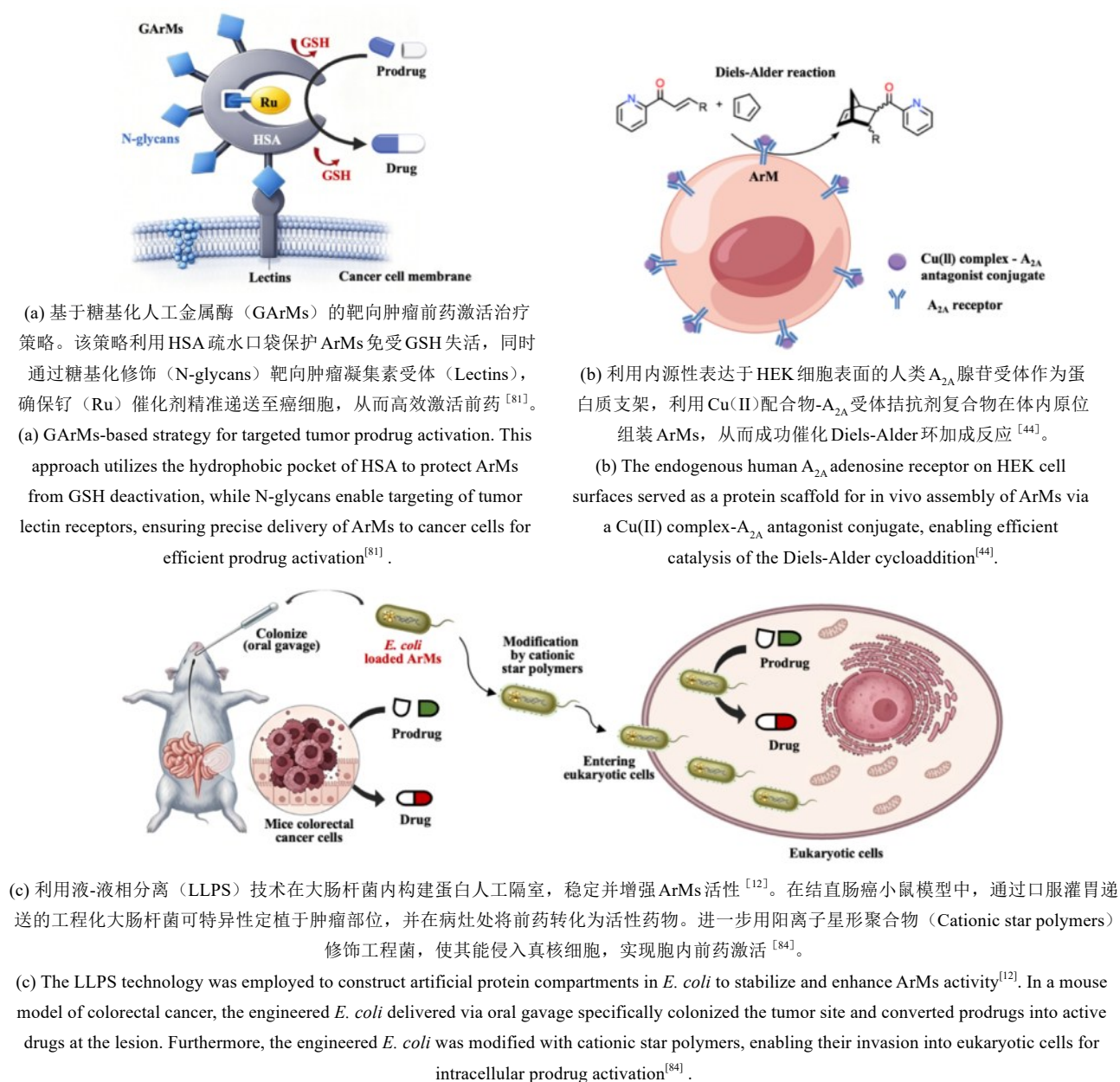


图4 基于ArMs的肿瘤靶向治疗策略

Fig. 4 Tumor-targeted treatment strategy based on ArMs.

435) 催化对映选择性脱羧曼尼希反应实现了 β -磺酰胺酮的合成，为手性含氮药物分子提供了绿色合成途径（图5c）^[88]。Huang等人首创“ArMs-光催化”协同体系，将Cu-ArMs与Ru(bpy)₃Cl₂光催化剂结合，实现了光驱动自由基不对称催化，成功应用于多种 α -手性酮的合成^[89]。上述体外研究系统验证了ArMs在药物中间体合成中的催化可行性与立体选择性优势，为全细胞体系的应用落地奠定了反应基础。

在此基础上发展的全细胞ArMs体系，进一步推动药物合成从体外纯化酶反应走向活细胞内的原位催化，技术覆盖范围也从原核细胞逐步拓展至真核细胞体系，为药物绿色合成提供了更具经济性的实施方案。在原核表达系统中，Chordia等人利用LmrR蛋白与Cu(II)-phen复合物通过超分子自组装，在大肠杆菌内构建了仿生微反应器。该体系成功实现了吡啶类化合物的高对映选择性Friedel-Crafts烷基化反应，为手性吡啶衍生物的生

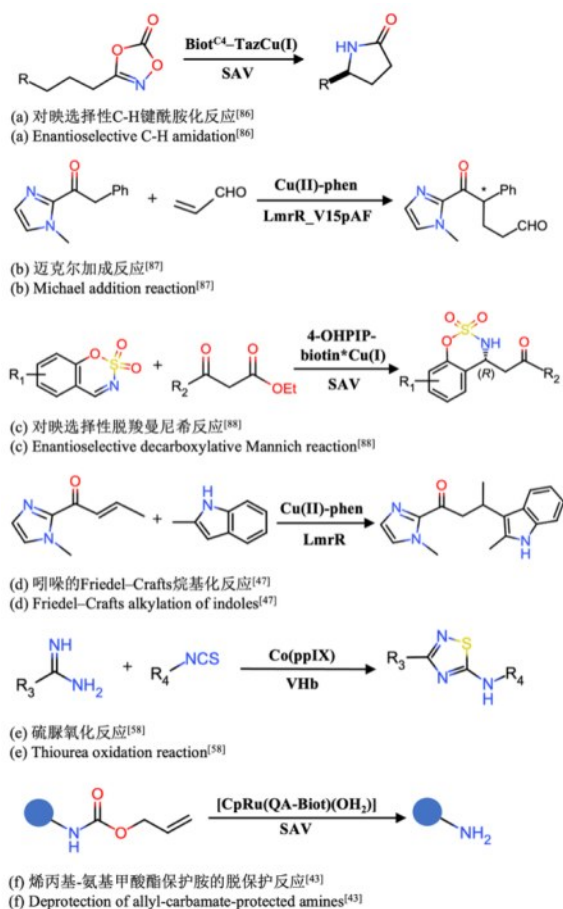


图5 由ArMs催化的药物合成的关键反应示例

Fig. 5 Key reaction examples of drug synthesis and modification catalyzed by ArMs

物合成提供了新策略（图5d）^[47]。Xu等人通过大肠杆菌表面展示系统构建了钴-卟啉人工血红蛋白（VHb-Co），将其作为人工硫脲氧化酶，成功实现了药物关键中间体5-亚氨基-1,2,4-噻二唑的高效合成（图5e）^[58]。在真核细胞领域，研究人员通过将 biot-Ru-SAV 催化剂复合物锚定于莱茵衣藻细胞表面，成功实现烯丙基-氨基甲酸酯保护胺的脱保护反应，证实了真核细胞表面原位药物合成的可行性（图5f）^[43]。这些开创性工作为药物分子原位合成提供了新策略，拓展了ArMs的体内应用前景。

全细胞ArMs体系更大的潜力体现在与细胞代谢网络的深度耦合。图6展示了两项代表性研究。其一，Huang等人通过在大肠杆菌中构建异源柠檬烯合成途径，结合ArMs（Ir-CYP119）催化原位生成的柠檬烯发生环丙烷化反应，首次在大肠杆菌体内实现了非天然萜类化合物——环丙基柠檬烯

的合成，为拓展萜类化合物结构多样性开辟了新途径^[11]。其二，Zou等人开发了以葡萄糖为原料的多步级联转化体系^[62]。该研究通过构建跨膜双酶系统，利用核糖体结合位点（ribosome binding site, RBS）工程精准调控外膜锚定ArMs（Ru1·hCAII）与内膜脱羧酶UndB的表达比例，实现了从葡萄糖经脂肪二酸、末端二烯到环烷烯的高效合成。上述案例体现了全细胞ArMs在多酶级联中的独特优势：可将非天然催化反应直接接入内源代谢网络，以胞内原位生成的代谢中间体为底物，实现从廉价基础碳源到非天然产物的一步法转化，无需外源添加昂贵的反应前体。近期，Zou等人进一步采用从头计算方法设计了可在细胞内高效工作的非天然复分解酶，为利用大肠杆菌细胞工厂催化合成生物成像荧光分子提供了创新催化平台^[90]。综上，ArMs全细胞催化体系已成为绿色生物合成领域的重要发展方向。未来，随着合成生物学、蛋白质工程和计算设计的深度融合，全细胞催化体系有望进一步突破限制，实现更复杂、更高效的级联反应，在实现碳循环利用、可再生能源转化等领域发挥核心作用。

4 总结与展望

全细胞ArMs通过将人工金属催化剂与活细胞系统整合，为非天然催化与生物制造的融合开辟了新路径。近年来，该领域在细胞组装定位策略、分子改造与筛选方法以及肿瘤靶向治疗与高值化学品生物合成应用等方面取得了显著进展，但距离实际工业应用仍有距离，当前四大核心瓶颈及现有解决策略梳理如下。

（1）金属辅因子稳定性和生物相容性挑战

在全细胞ArM体系中，金属辅因子的稳定性与生物相容性是限制其应用的核心问题之一。胞内还原性物质和金属螯合成分易引起金属活性中心失活或沉淀。同时，游离金属离子或金属配合物可能非特异性地结合蛋白质、核酸、脂质等生物大分子，造成细胞毒性并干扰代谢平衡。

针对上述问题，可从空间隔离、配位环境优化和人工区室构建等方面开展系统设计。首先，将ArMs定位至细胞周质或表面，利用膜结构实现

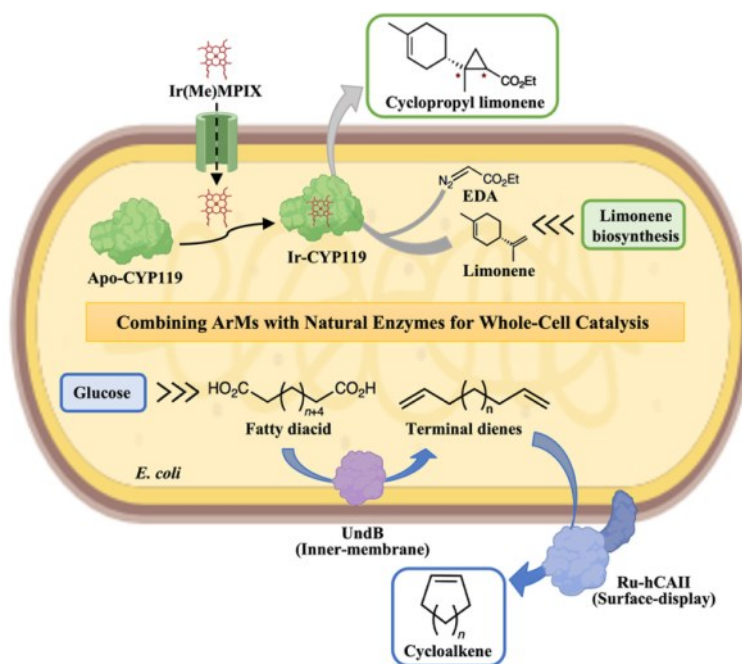


图6 基于整合 ArMs 与天然酶的全细胞催化体系示意图。

(上图展示了以柠檬烯 (Limonene) 为底物的环丙烷化反应体系: 通过在大肠杆菌内构建异源柠檬烯合成途径实现内源柠檬烯的生产, 并将铱-卟啉复合物 Ir (Me) MPIX 与脱辅基蛋白 CYP119 组装成 Ir-CYP119, 利用重氮底物 EDA 催化柠檬烯发生环丙烷化反应, 生成环丙基柠檬烯 (Cyclopropyl limonene)^[11]。下图展示了以葡萄糖为起点的环烷烯 (Cycloalkene) 合成体系: 葡萄糖经胞内代谢转化为脂肪二酸 (Fatty diacid), 内膜脱羧酶 UndB 催化其脱羧为末端二烯 (Terminal dienes); 大肠杆菌表面展示的 Ru-hCAII 进一步催化末端二烯环化, 生成环烷烯^[62]。)

Fig. 6 Schematic diagram of a whole-cell catalytic system integrating ArMs with natural enzymes.

(The figure above illustrates a cyclopropanation system using limonene as the substrate: an engineered *E. coli* strain produces endogenous limonene via a heterologous biosynthetic pathway. The iridium-porphyrin complex Ir(Me)MPIX is assembled with the apoprotein CYP119 to form Ir-CYP119, which catalyzes the cyclopropanation of limonene using the diazo compound EDA as a substrate, yielding cyclopropyl limonene^[11]. The figure below depicts a cycloalkene synthesis system starting from glucose: glucose is metabolically converted into fatty diacid intracellularly, which is subsequently decarboxylated by the inner-membrane decarboxylase UndB to form terminal dienes. These dienes are then cyclized by the surface-displayed Ru-hCAII enzyme on *E. coli*, producing cycloalkene^[62].)

物理隔离, 以降低胞内环境对金属活性中心的干扰。其次, 可采用 RifGen/RifDock 和 Rosetta FastDesign 等计算生物学工具优化金属配位微环境^[13], 或利用遗传密码扩展技术引入非天然氨基酸以构建精准的金属整合位点。此外, 通过构建亚细胞仿生隔室形成局部隔离的催化微环境, 并结合交联剂等元件的理性优化^[91], 可进一步提升 ArMs 在全细胞催化体系中的结构稳定性与催化效率。

(2) 蛋白质表达调控挑战

在全细胞催化体系中, 异源表达 ArMs 需在酶活性与细胞生理状态之间取得精细平衡。若表达水平不足, 会导致催化剂数量受限, 影响整体反应速率; 反之, 过量表达不仅增加代谢负担, 还可能引起蛋白聚集、内源性通路抑制乃至细胞毒性, 最终削弱催化体系的整体性能^[62, 92]。通过机器学习优化核糖体结合位点 (RBS), 并结合诱导

型启动子实现时空调控, 已成为精细调节蛋白表达水平、确保 ArMs 高效且功能完整的关键策略。

(3) 催化性能优化挑战

全细胞体系中的 ArMs 常因结构特异性强, 难以适应多种底物, 且胞内复杂环境 (如 pH、离子强度、氧化还原状态和竞争配体等) 也可能影响金属中心的构型与反应路径, 进而削弱反应速率、选择性和产物纯度。采用多尺度计算建模与定向进化相结合的策略, 可理性设计底物结合口袋并构建高质量突变体库^[93]; 结合基于全细胞的高通量筛选技术, 能够快速迭代并提升 ArMs 的催化效率。从工程化角度, 连续流反应系统、双相反应体系及辅因子再生系统的开发, 系统性改善了全细胞 ArMs 的底物与产物传质效率与催化经济性^[94-96]。

(4) 肿瘤靶向治疗挑战

在将全细胞催化体系应用于肿瘤靶向治疗时,

ArMs常面临递送效率低、肿瘤组织富集不足及微环境响应性弱等挑战。对于细菌或工程细胞递送系统而言,如何在提高肿瘤靶向性的同时避免非特异性组织分布、免疫清除和潜在感染风险,是体内应用必须解决的问题。此外,ArMs在体内环境中的金属稳定性、催化选择性和长期代谢归宿也需要进一步系统评估。针对这些挑战,可通过多模态工程策略提升治疗精准性与安全性。例如,通过细胞表面展示肿瘤特异性配体来增强主动靶向能力^[97, 98];设计生物矿化工程化的细菌外膜囊泡以实现微环境响应性释放^[99, 100];以及结合超声介导靶向技术,利用微泡效应增强细胞在肿瘤部位的聚集效率^[101, 102]。

综上所述,全细胞ArMs正处于从“概念验证”迈向“系统化应用”的关键转折期。展望未来,该技术将向以下方向深入发展:一是计算驱动的精准设计,借助AlphaFold3、ProteinMPNN与LigandMPNN等平台实现金属配位环境与蛋白骨架的全原子级协同设计,并结合生成式蛋白设计拓展卡宾/氮烯插入、不对称光催化等新型非天然反应;二是智能化的分子改造闭环,整合自动化液体工作站、高通量分析平台与机器学习模型,实现从文库设计到优势变体鉴定的全流程自动化迭代;三是与合成生物学的深度耦合,通过组装包含多个非天然金属酶步骤的“非天然代谢途径”,实现从简单碳源到复杂目标产物的全流程生物制造;四是临床与工业应用转化,聚焦活体诊疗一体化系统与连续流生物催化平台,推动全细胞ArMs从实验室概念验证走向实际应用。

随着人工智能和合成生物学技术的深度融合,全细胞ArMs技术有望实现从理性分子设计到智能系统集成的跨越,最终构建出高效、可定制的下一代生物制造平台,为生物制造、绿色化学、精准医疗的可持续发展提供创新性解决方案。

致谢:在文献调研、图表绘制与稿件修改过程中,诸位老师与同学给予了大量帮助与宝贵建议,在此一并致以诚挚感谢。

作者贡献声明:张英娇:搜集整理全部相关文献,起草全文初稿,绘制文中示意图与表格;刘晓宇、王云鹏:分类梳理领域研究进展,校对图表、润色中英文摘要;相林:梳理各章节论述逻辑,修订正文内容;

李春:统筹论文整体思路,统筹稿件修改打磨,终稿审定及投稿统筹;王润铭:把控文章整体学术脉络,全文审核、细致审阅稿件,提出修改意见并完善核心论述;所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突:李春是本刊编委,在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者声明没有利益冲突。

参 考 文 献

- [1] VALDEZ C E, SMITH Q A, NECHAY M R, et al. Mysteries of metals in metalloenzymes [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(10): 3110-3117.
- [2] SCHMID A, DORDICK J S, HAUER B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 258-268.
- [3] DAVIS H J, WARD T R. Artificial Metalloenzymes: Challenges and Opportunities [J]. *ACS Central Science*, 2019, 5(7): 1120-1136.
- [4] AKABORI S, SAKURAI S, IZUMI Y, et al. An Asymmetric Catalyst [J]. *Nature*, 1956, 178(4528).
- [5] WILSON M E, WHITESIDES G M. Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium (I) moiety [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(1): 306-307.
- [6] YEUNG N, LIN Y-W, GAO Y-G, et al. Rational design of a structural and functional nitric oxide reductase [J]. *Nature*, 2009, 462(7276): 1079-1082.
- [7] MIRTS E N, PETRIK I D, HOSSEINZADEH P, et al. A designed heme- [4Fe-4S] metalloenzyme catalyzes sulfite reduction like the native enzyme [J]. *Science*, 2018, 361(6407): 1098-1101.
- [8] SONG W J, TEZCAN F A. A designed supramolecular protein assembly with in vivo enzymatic activity [J]. *Science*, 2014, 346(6216): 1525-1528.
- [9] KALVET I, ORTMAYER M, ZHAO J, et al. Design of heme enzymes with a tunable substrate binding pocket adjacent to an open metal coordination site [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(26): 14307-14315.
- [10] BASLER S, STUDER S, ZOU Y, et al. Efficient Lewis acid catalysis of an abiological reaction in a de novo protein scaffold [J]. *Nature Chemistry*, 2021, 13(3): 231-235.
- [11] HUANG J, LIU Z, BLOOMER B J, et al. Unnatural biosynthesis by an engineered microorganism with heterologously expressed natural enzymes and an artificial metalloenzyme [J]. *Nature Chemistry*, 2021, 13(12): 1186-

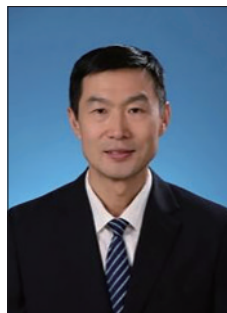
- 1191.
- [12] WU T, CHEN X, FEI Y, et al. Artificial metalloenzyme assembly in cellular compartments for enhanced catalysis [J]. *Nature Chemical Biology*, 2025, 21(5): 779-789.
- [13] MORRIS E, LOZHKIN B, UHRHAN J, et al. Design, Optimization and Characterization of a *de novo* Gold Hydroaminase [J]. *ACS Catalysis*, 2026, 16(7): 6387-6395.
- [14] WITTEW M, MARKEL U, SCHIFFELS J, et al. Engineering and emerging applications of artificial metalloenzymes with whole cells [J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(10): 814-827.
- [15] YAO Y, SU W, WU T, et al. Deploying Artificial Metalloenzymes in Complex Environments: Strategies and Applications [J]. *ChemBioChem*, 2026, 27(13): e70446.
- [16] JESCHEK M, REUTER R, HEINISCH T, et al. Directed evolution of artificial metalloenzymes for in vivo metathesis [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 661-665.
- [17] LIU Z, HUANG J, GU Y, et al. Assembly and Evolution of Artificial Metalloenzymes within *E. coli* Nissle 1917 for Enantioselective and Site-Selective Functionalization of C—H and C = C Bonds [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(2): 883-890.
- [18] ALONSO-COTCHICO L, RODRÍGUEZ-GUERRA J, LLEDOS A, et al. Molecular modeling for artificial metalloenzyme design and optimization [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2020, 53(4): 896-905.
- [19] MARKEL U, SAUER D F, SCHIFFELS J, et al. Towards the evolution of artificial metalloenzymes—A protein engineer's perspective [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(14): 4454-4464.
- [20] LOVELOCK S L, CRAWSHAW R, BASLER S, et al. The road to fully programmable protein catalysis [J]. *Nature*, 2022, 606(7912): 49-58.
- [21] LI Z Q, DENG Y T, YANG G Y. Growth-coupled high throughput selection for directed enzyme evolution [J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 68: 108238.
- [22] KEASLING J D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(3): 189-195.
- [23] SCHWIZER F, OKAMOTO Y, HEINISCH T, et al. Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies [J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 142-231.
- [24] VORNHOLT T, LEISS-MAIER F, JEONG W J, et al. Artificial metalloenzymes [J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2024, 4(1): 78.
- [25] NATOLI S N, HARTWIG J F. Noble — Metal Substitution in Hemoproteins: An Emerging Strategy for Abiological Catalysis [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 326-335.
- [26] HIROTA S, LIN Y-W. Design of artificial metalloproteins/metalloenzymes by tuning noncovalent interactions [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, 23(1): 7-25.
- [27] DÜRREBERGER M, WARD T R. Recent achievements in the design and engineering of artificial metalloenzymes [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 99-106.
- [28] ROSATI F, ROELFES G. Artificial Metalloenzymes [J]. *ChemCatChem*, 2010, 2(8): 916-927.
- [29] 刘小妍, 黄超群, 金雪芮, 等. 人工金属酶研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43: 72-84.
- LIU X Y, HUANG C Q, JIN X R, et al. Research progress of artificial metalloenzymes [J]. *China Biotechnology*, 2023, 43: 72-84.
- [30] WOLFE J A, HORNE W S. Application of artificial backbone connectivity in the development of metalloenzyme mimics [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2024, 81: 102509.
- [31] LIN Y-W. Rational design of metalloenzymes: From single to multiple active sites [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 336: 1-27.
- [32] ILIE A, REETZ M T. Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes [J]. *Israel Journal of Chemistry*, 2015, 55(1): 51-60.
- [33] MIRTS E N, BHAGI-DAMODARAN A, LU Y. Understanding and Modulating Metalloenzymes with Unnatural Amino Acids, Non-Native Metal Ions, and Non-Native Metallocofactors [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(4): 935-944.
- [34] ZOU Z, HIGGINSON B, WARD T R. Creation and optimization of artificial metalloenzymes: Harnessing the power of directed evolution and beyond [J]. *Chem*, 2024, 10(8): 2373-2389.
- [35] REETZ M T. Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes: A Universal Means to Tune the Selectivity of Transition Metal Catalysts? [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 336-344.
- [36] MORITA I, WARD T R. Recent advances in the design and optimization of artificial metalloenzymes [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2024, 81: 102508.
- [37] LEWIS J C. Artificial Metalloenzymes and Metallopeptide Catalysts for Organic Synthesis [J]. *ACS Catalysis*, 2013, 3(12): 2954-2975.
- [38] JESCHEK M, PANKE S, WARD T R. Artificial Metalloenzymes on the Verge of New-to-Nature Metabolism [J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(1): 60-72.
- [39] YANG X, GERROLL B H R, JIANG Y, et al. Controlling Non-Native Cobalamin Reactivity and Catalysis in the Transcription Factor CarH [J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(2): 935-942.
- [40] LEVESON-GOWER R B, MAYER C, ROELFES G. The importance of catalytic promiscuity for enzyme design and evolution [J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2019, 3(12): 687-705.
- [41] KATO S, ONODA A, SCHWANEBERG U, et al. Evolutionary

- Engineering of a Cp*Rh(III) Complex-Linked Artificial Metalloenzyme with a Chimeric β -Barrel Protein Scaffold [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(15): 8285-8290.
- [42] WILSON Y M, DÜRRENBERGER M, NOGUEIRA E S, et al. Neutralizing the Detrimental Effect of Glutathione on Precious Metal Catalysts [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(25): 8928-8932.
- [43] SZPONARSKI M, SCHWIZER F, WARD T R, et al. On-cell catalysis by surface engineering of live cells with an artificial metalloenzyme [J]. *Communications Chemistry*, 2018, 1(1): 84.
- [44] GHATTAS W, DUBOSCLARD V, WICK A, et al. Receptor-Based Artificial Metalloenzymes on Living Human Cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(28): 8756-8762.
- [45] WINTER M B, MCLAURIN E J, REECE S Y, et al. Rurporphyrin protein scaffolds for sensing O₂ [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(16): 5582-5583.
- [46] NAUGHTON K J, TREVIÑO R E, MOORE P J, et al. In Vivo Assembly of a Genetically Encoded Artificial Metalloenzyme for Hydrogen Production [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(8): 2116-2120.
- [47] CHORDIA S, NARASIMHAN S, LUCINI PAIONI A, et al. In vivo assembly of artificial metalloenzymes and application in whole-cell biocatalysis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(11): 5913-5920.
- [48] BROUWER B, DELLA-FELICE F, ILLIES J H, et al. Noncanonical Amino Acids: Bringing New-to-Nature Functionalities to Biocatalysis [J]. *Chemical reviews*, 2024, 124(19): 10877-10923.
- [49] DRIENOVSKÁ I, RIOZ-MARTÍNEZ A, DRAKSHARAPU A, et al. Novel artificial metalloenzymes by in vivo incorporation of metal-binding unnatural amino acids [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(1): 770-776.
- [50] DRIENOVSKÁ I, SCHEELE R A, GUTIÉRREZ DE SOUZA C, et al. A Hydroxyquinoline-Based Unnatural Amino Acid for the Design of Novel Artificial Metalloenzymes [J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(21): 3077-3081.
- [51] DUAN H-Z, HU C, LI Y-L, et al. Genetically Encoded Phosphine Ligand for Metalloprotein Design [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(50): 22831-22837.
- [52] VEEN M J, AALBERS F S, ROZEBOOM H J, et al. Artificial Gold Enzymes Using a Genetically Encoded Thiophenol-Based Noble-Metal-Binding Ligand [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(12): e202421912.
- [53] OFORI ATTA L, ZHOU Z, ROELFES G. In Vivo Biocatalytic Cascades Featuring an Artificial-Enzyme-Catalysed New-to-Nature Reaction [J]. *Angewandte Chemie*, 2023, 135(1): e202214191.
- [54] ZHAO J, REBELEIN J G, MALLIN H, et al. Genetic engineering of an artificial metalloenzyme for transfer hydrogenation of a self-immolative substrate in *Escherichia coli*'s periplasm [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(41): 13171-13175.
- [55] VORNHOLT T, CHRISTOFFEL F, PELLIZZONI M M, et al. Systematic engineering of artificial metalloenzymes for new-to-nature reactions [J]. *Science Advances*, 2021, 7(4): eabe4208.
- [56] REBELEIN J G, COTELLE Y, GARABEDIAN B, et al. Chemical Optimization of Whole-Cell Transfer Hydrogenation Using Carbonic Anhydrase as Host Protein [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4173-4178.
- [57] HEINISCH T, SCHWIZER F, GARABEDIAN B, et al. *E. coli* surface display of streptavidin for directed evolution of an allylic deallylase [J]. *Chemical science*, 2018, 9(24): 5383-5388.
- [58] XU Y, LI F, XIE H, et al. Directed evolution of *Escherichia coli* surface-displayed Vitreoscilla hemoglobin as an artificial metalloenzyme for the synthesis of 5-imino-1, 2, 4-thiadiazoles [J]. *Chemical Science*, 2024, 15(20): 7742-7748.
- [59] STEIN A, CHEN D, IGARETA N V, et al. A Dual Anchoring Strategy for the Directed Evolution of Improved Artificial Transfer Hydrogenases Based on Carbonic Anhydrase [J]. *ACS Central Science*, 2021, 7(11): 1874-1884.
- [60] BECKER S, THEILE S, HEPPELER N, et al. A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes [J]. *FEBS letters*, 2005, 579(5): 1177-1182.
- [61] GRIMM A R, SAUER D F, POLEN T, et al. A whole cell *E. coli* display platform for artificial metalloenzymes: poly(phenylacetylene) production with a rhodium - nitrobindin metalloprotein [J]. *ACS catalysis*, 2018, 8(3): 2611-2614.
- [62] ZOU Z, WU S, GERNGROSS D, et al. Combining an artificial metathase with a fatty acid decarboxylase in a whole cell for cycloalkene synthesis [J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(9): 1113-1123.
- [63] JEONG W J, SONG W J. Design and directed evolution of noncanonical β -stereoselective metalloglycosidases [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6844.
- [64] LIN B X, TAO Y. Whole-cell biocatalysts by design [J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 106.
- [65] GARGIULO S, SOUMILLION P. Directed evolution for enzyme development in biocatalysis [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 61: 107-113.
- [66] PRITCHARD L, CORNE D, KELL D, et al. A general model of error-prone PCR [J]. *Journal of theoretical biology*, 2005, 234(4): 497-509.
- [67] STEMMER W P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling [J]. *Nature*, 1994, 370(6488): 389-391.
- [68] YANG H, SWARTZ A M, PARK H J, et al. Evolving artificial

- metalloenzymes via random mutagenesis [J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(3): 318-324.
- [69] QU G, LI A, ACEVEDO-ROCHA C G, et al. The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(32): 13204-13231.
- [70] LEMAN J K, WEITZNER B D, LEWIS S M, et al. Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 665-680.
- [71] REETZ M T, BOCOLA M, CARBALLEIRA J D, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test [J]. *Angew Chem, Int Ed*, 2005, 44(27): 4192-4196.
- [72] REETZ M T, PRASAD S, CARBALLEIRA J D, et al. Iterative Saturation Mutagenesis Accelerates Laboratory Evolution of Enzyme Stereoselectivity: Rigorous Comparison with Traditional Methods [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(26): 9144-9152.
- [73] MUKHERJEE P, SAIRAMAN A, DEKA H J, et al. Enantiodivergent synthesis of isoindolones catalysed by a Rh (III) -based artificial metalloenzyme [J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(7): 835-845.
- [74] MALLIN H, HESTERICOVÁ M, REUTER R, et al. Library design and screening protocol for artificial metalloenzymes based on the biotin-streptavidin technology [J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(5): 835-852.
- [75] HESTERICOVÁ M, HEINISCH T, ALONSO-COTCHICO L, et al. Directed Evolution of an Artificial Imine Reductase [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(7): 1863-1868.
- [76] BAIYOU MY A, VALLAPURACKAL J, SCHWIZER F, et al. Directed evolution of a surface-displayed artificial allylic deallylase relying on a GFP reporter protein [J]. *ACS catalysis*, 2021, 11(17): 10705-10712.
- [77] VALLAPURACKAL J, STUCKI A, LIANG A D, et al. Ultrahigh-throughput screening of an artificial metalloenzyme using double emulsions [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(48): e202207328.
- [78] CHRISTOFFEL F, IGARETA N V, PELLIZZONI M M, et al. Design and evolution of chimeric streptavidin for protein-enabled dual gold catalysis [J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(8): 643-653.
- [79] GU Y, BLOOMER B J, LIU Z, et al. Directed evolution of artificial metalloenzymes in whole cells [J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 134(5): e202110519.
- [80] SRIVASTAVA P, YANG H, ELLIS-GUARDIOLA K, et al. Engineering a dirhodium artificial metalloenzyme for selective olefin cyclopropanation [J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 7789.
- [81] EDA S, NASIBULLIN I, VONG K, et al. Biocompatibility and therapeutic potential of glycosylated albumin artificial metalloenzymes [J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(9): 780-792.
- [82] IMAI K, MUGURUMA K, NAKAMURA A, et al. In vivo synthetic anticancer approach by resourcing mouse blood albumin as a biocompatible artificial metalloenzyme [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(43): e202411225.
- [83] GAO Z, QIN K, HE W, et al. Chemocatalytic Cell Tagging Platform for Recording Cell-Cell Interactions via Engineered Palladium -Based Artificial Metalloenzymes [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(20): e202424738.
- [84] WU T, FEI Y, DENG Y, et al. Creation of Artificial Subcellular Organelles Using Compartmentalized *Escherichia coli* Bodies for Artificial Metalloenzyme-Mediated Abiotic Catalysis in Eukaryotic Cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147(18): 15229-15241.
- [85] LI Y, HAO Y, LI X, et al. Engineering artificial metalloenzymes for targeted biocatalysis in living organism [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 520: 166074.
- [86] RUMO C, STEIN A, KLEHR J, et al. An artificial metalloenzyme based on a copper heteroscorpionate enables sp^3 C - H functionalization via intramolecular carbene insertion [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(26): 11676-11684.
- [87] ZHOU Z, ROELFES G. Synergistic catalysis in an artificial enzyme by simultaneous action of two abiological catalytic sites [J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 289-294.
- [88] TANG Y, XU Y, ZHANG X, et al. Enzyme-Controlled Bidirectional Enantioselectivity in Asymmetric Decarboxylative Mannich Reaction for Synthesizing β -Sulfonamide Ketones [J]. *ACS Catalysis*, 2025, 15(6): 4784-4797.
- [89] ZHANG J, ZHANG Q, GE R, et al. Enantiodivergent Radical Alkylation by Synergistic Lewis-Acid-Enzyme and Photoredox Catalysis [J]. *Angewandte Chemie*, 2025, 64(25): e202500338.
- [90] ZOU Z, KALVET I, LOZHKKIN B, et al. De novo design and evolution of an artificial metathase for cytoplasmic olefin metathesis [J]. *Nature Catalysis*, 2025, 8(11): 1208-1219.
- [91] ZHANG G, ZHANG A, ZHANG L, et al. The Impact of Structure Refinement in the Construction of Whole-Cell Catalysts with Artificial Metalloenzymes Assembled in Artificial Sanctuaries [J]. *Biomacromolecules*, 2025, 26(12): 8837-8847.
- [92] YU W, JIN K, XU X, et al. Engineering microbial cell factories by multiplexed spatiotemporal control of cellular metabolism: Advances, challenges, and future perspectives [J]. *Biotechnology Advances*, 2025, 79: 108497.

- [93] LA GATTA S, PECORARO V L. Recent advances in de novo designed metallopeptides as tailored enzyme mimics [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2025, 86: 102586.
- [94] SANTI M, SANCINETO L, NASCIMENTO V, et al. Flow biocatalysis: A challenging alternative for the synthesis of APIs and natural compounds [J]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(3): 990.
- [95] AU S K, BOMMARIUS B R, BOMMARIUS A S. Biphasic Reaction System Allows for Conversion of Hydrophobic Substrates by Amine Dehydrogenases [J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(11): 4021-4026.
- [96] ZHANG Y, ZHANG J, CAI S, et al. Molecular Engineering and Utilization of Cyclohexanone Monooxygenase in the Cascade Biocatalytic Synthesis of ϵ -Caprolactone [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, 13(17): 6090-6101.
- [97] MA W, YANG Y, ZHU J, et al. Biomimetic nanoerythrocyte-coated aptamer - DNA tetrahedron/maytansine conjugates: pH-responsive and targeted cytotoxicity for HER2-positive breast cancer [J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(46): 2109609.
- [98] CHEN H, BAO Y, LI X, et al. Cell Surface Engineering by Phase - Separated Coacervates for Antibody Display and Targeted Cancer Cell Therapy [J]. *Angewandte Chemie*, 2024, 136(44): e202410566.
- [99] LI Q-R, ZHANG X, ZHANG C, et al. Biomaterialized Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as cGAS-STING Nanoagonists Synergize with Lactate Metabolism Modulation to Potentiate Immunotherapy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147(28): 24555 - 24572.
- [100] QING S, LYU C, ZHU L, et al. Biomaterialized Bacterial Outer Membrane Vesicles Potentiate Safe and Efficient Tumor Microenvironment Reprogramming for Anticancer Therapy [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(47): 2002085.

- [101] YANG Y, WANG Y, ZENG F, et al. Ultrasound-visible engineered bacteria for tumor chemo-immunotherapy [J]. *Cell Reports Medicine*, 2024, 5(5): 101512.
- [102] HUANG J, ZHANG L, ZHENG J, et al. Microbubbles-assisted ultrasonication to promote tumor accumulation of therapeutics and modulation of tumor microenvironment for enhanced cancer treatments [J]. *Biomaterials*, 2023, 299: 122181.



共同通讯作者: 李春(1970—),男,教授,博士,博士生导师。研究方向为细胞工厂数字化设计与工程应用,微生物合成植物天然产物(甘草)。

E-mail: lichun@tsinghua.edu.cn



共同通讯作者: 王润铭(1989—),男,副教授,博士,博士生导师。研究方向为金属蛋白(肽)与金属药物的智能挖掘设计与精准生物制造。

E-mail: runmingwang@sz.tsinghua.edu.cn



第一作者: 张英娇(1998—),女,博士研究生,研究方向为金属蛋白肽的合成生物制造与人工金属酶全细胞催化体系的开发等。

E-mail: zhangyingjiao25@mails.tsinghua.edu.cn